

BEST AVAILABLE COPY

PCT/JP2004/011812

13. 9. 2004

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日
Date of Application: 2003年 8月11日

出 願 番 号
Application Number: 特願2003-207165
[ST. 10/C]: [JP2003-207165]

REC'D 04 NOV 2004	
WIPO	PCT

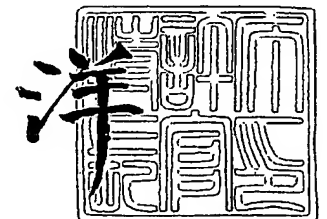
出 願 人
Applicant(s): 中外製薬株式会社

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2004年10月21日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

小 川



出証番号 出証特2004-3094828

【書類名】 特許願

【整理番号】 1033985

【提出日】 平成15年 8月11日

【あて先】 特許庁長官 今井 康夫 殿

【国際特許分類】 C07K 16/18

【発明の名称】 糖鎖改変抗HM1. 2 4 抗体

【請求項の数】 10

【発明者】

 【住所又は居所】 静岡県御殿場市駒門 1 - 1 3 5 中外製薬株式会社内

 【氏名】 土屋 政幸

【発明者】

 【住所又は居所】 静岡県御殿場市駒門 1 - 1 3 5 中外製薬株式会社内

 【氏名】 飯島 成幸

【発明者】

 【住所又は居所】 静岡県御殿場市駒門 1 - 1 3 5 中外製薬株式会社内

 【氏名】 周郷 泉

【発明者】

 【住所又は居所】 神奈川県鎌倉市梶原 2 0 0 中外製薬株式会社内

 【氏名】 杉本 正道

【特許出願人】

 【識別番号】 000003311

 【氏名又は名称】 中外製薬株式会社

【代理人】

 【識別番号】 100099759

 【弁理士】

 【氏名又は名称】 青木 篤

 【電話番号】 03-5470-1900

【選任した代理人】

【識別番号】 100077517

【弁理士】

【氏名又は名称】 石田 敬

【選任した代理人】

【識別番号】 100087871

【弁理士】

【氏名又は名称】 福本 積

【選任した代理人】

【識別番号】 100087413

【弁理士】

【氏名又は名称】 古賀 哲次

【選任した代理人】

【識別番号】 100082898

【弁理士】

【氏名又は名称】 西山 雅也

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 209382

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9814920

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 糖鎖改変抗HM1.24抗体

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 糖鎖の改変により抗体依存性細胞傷害性 (Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity ; ADCC) が増強された、HM1.24抗原に対する抗体 (抗HM1.24抗体)。

【請求項 2】 前記抗体がモノクローナル抗体である、請求項 1 に記載の抗体。

【請求項 3】 前記抗体がキメラ抗体である、請求項 1 に記載の抗体。

【請求項 4】 前記抗体がヒト型化抗体である、請求項 1 に記載の抗体。

【請求項 5】 α -1,6コアーフコース (α -1,6core fucose) を含まない糖鎖を有する、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の抗体。

【請求項 6】 バイセクティング (bisecting) N-アセチルグルコサミン (GlcNAc) 構造を有する糖鎖を有する、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の抗体。

【請求項 7】 α -1,6コアーフコース (α -1,6core fucose) を含まない糖鎖を有し、且つバイセクティング (bisecting) N-アセチルグルコサミン (GlcNAc) 構造を有する糖鎖を有する、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の抗体。

【請求項 8】 請求項 5 に記載の抗体製造方法において、HM1.24抗原に対する抗体 (抗HM1.24抗体) をコードする核酸が導入された糖鎖へのフコース付加能力を欠失した細胞を培養し、そして当該培養物から当該抗体を採取することを特徴とする方法。

【請求項 9】 請求項 6 に記載の抗体の製造方法において、N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼIII (GnTIII) をコードする核酸を導入した宿主細胞を培養し、当該培養物から当該抗体を採取することを特徴とする方法。

【請求項 10】 請求項 7 に記載の抗体の製造方法において、N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼIII (GnTIII) をコードする核酸を導入した糖鎖へのフコース付加能力を欠失した細胞を培養し、そして当該培養物から当該抗体を採取することを特徴とする方法。

【発明の詳細な説明】**【0001】****【発明の属する技術分野】**

本発明は、抗体依存性細胞傷害性 (Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity; ADCC) が増強された、HM1.24抗原に対する抗体 (抗HM1.24抗体) 及びその製造方法に関する。

【0002】**【従来の技術】**

HM1.24抗原は、骨髓腫細胞表面に高発現する分子量29～33kDaの膜蛋白質であり (Ishikawa J. et al., Genomics 26(1995), 527-534)、骨髓腫細胞以外にもB腫瘍細胞及びT腫瘍細胞においても発現が認められている。正常細胞においては、イムノグロブリン産生B細胞や活性化T細胞で確認されており、その他の細胞においてはほとんど発現が認められていない (Goto T. et al., Blood 84(1994), 1922-1930)。

【0003】

HM1.24抗原の上記の如き組織分布のため、HM1.24抗原に対する抗体 (抗HM1.24抗体) は、腫瘍に特異的に集積するため、この抗体をラジオアイソトープで標識することによる腫瘍局在の診断や、ラジオイムノセラピー (radioimmunotherapy) などのミサイル療法への利用が期待されるほか、抗HM1.24抗体は、それ自体、抗体依存性細胞傷害性 (Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity; ADCC) を有する (Ozaki S. et al., Blood 90(1997), 3179-3186) ので、多発性骨髓腫などの骨髓腫治療薬などとしての利用が期待される。

【0004】

このような、抗HM1.24抗体の療法的使用に当っては、ヒトに対する免疫原性が低いことが望ましく、このため抗HM1.24抗体の再構成ヒト (ヒト型化) 抗体が開発されている (WO 98/14580)。しかしながら、ADCC活性が一層増強されたHM1.24抗体、特にADCC活性が増強されたヒト型化HM1.24抗体の提供が望まれている。

【0005】

抗体のADCC活性を増強する方法としては、抗体の糖鎖を改変する方法が知られ

ている。例えば、WO 99/54342には、抗体のグリコシル化を修飾することによりADCC活性を改良することが記載されている。また、WO 00/61739には、抗体の糖鎖におけるフコースの存否によりADCC活性を調節することが記載されている。WO 02/31140には、YB2/0細胞において抗体を産生せしめることにより、 α -1,6core fucoseを含まない糖鎖を有する抗体を調製することが記載されている。WO 02/79255には、バイセクティングGlcNAcを有する糖鎖を有する抗体が記載されている。しかしながら、糖鎖の修飾によってADCC活性が増強されたHM1.24抗体は知られていない。

【0006】**【特許文献1】**

WO 98/14580

【特許文献2】

WO 99/54342

【特許文献3】

WO 00/61739

【特許文献4】

WO 02/31140

【特許文献5】

WO 02/79255

【0007】**【非特許文献1】**

Ishikawa J. et al., Genomics 26(1995), 527-534

【非特許文献2】

Goto T. et al., Blood 84(1994), 1922-1930

【非特許文献3】

Ozaki S. et al., Blood 90(1997), 3179-3186

【0008】**【発明が解決しようとする課題】**

従って、本発明は糖鎖の修飾によってADCC活性が増強された抗HM1.24抗体及び

その製造方法を提供しようとするものである。

【0009】

本発明者は上記の課題を解決すべく種々検討した結果、 α -1,6コアーフコース (α -1,6core fucose) (還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位とフコースの1位とが α 結合している。) を含まない糖鎖を有する抗HM1.24抗体、及びバイセクティング (bisecting) N-アセチルグルコサミン (GlcNAc) 構造を有する糖鎖を有する抗体が高いADCC活性を有するほか、 α -1,6コアーフコース (α -1,6core fucose) を含まない糖鎖とバイセクティング (bisecting) N-アセチルグルコサミン (GlcNAc) 構造を有する糖鎖を共に有する抗HM1.24抗体が、一層高いADCC活性を有することを見出し本発明を完成した。

【0010】

従って本発明は、糖鎖の改変により抗体依存性細胞傷害性 (Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity; ADCC) が増強された、HM1.24抗原に対する抗体 (抗HM1.24抗体) を提供する。この抗体は、典型的にはモノクローナル抗体またはそれに由来する抗体であり、例えばキメラ抗体、又は更に好ましくはヒト型化抗体である。より具体的には、本発明は、 α -1,6コアーフコース (α -1,6core fucose) を含まない糖鎖を有する抗体、及びバイセクティング (bisecting) N-アセチルグルコサミン (GlcNAc) 構造を有する糖鎖を有する抗体、更には、 α -1,6コアーフコース (α -1,6core fucose) を含まない糖鎖を有し、且つバイセクティング (bisecting) N-アセチルグルコサミン (GlcNAc) 構造を有する糖鎖を有する抗体を提供する。

【0011】

本発明はまた、上記の糖鎖が修飾された抗体製造方法において、HM1.24抗原に対する抗体 (抗HM1.24抗体) をコードする核酸が導入されたYB2/0細胞を培養し、そして当該培養物から当該抗体を採取することを特徴とする方法; N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼIII (GnTIII) をコードする核酸を導入した宿主細胞を培養し、当該培養物から当該抗体を採取することを特徴とする方法; 並びに、N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼIII (GnTIII) をコードする核酸を導入したYB2/0細胞を培養し、そして当該培養物から当該抗

体を採取することを特徴とする方法を提供する。

【0012】

【発明の実施の形態】

本発明の糖鎖の修飾によりADCC活性が増強された抗HM1.24抗体を得るには、 α -1,6コアーフコース (α -1,6core fucose) を付加する能力を有しないか又はその能力が低い宿主細胞中で抗HM1.24抗体を発現させるか、あるいは糖鎖にバイセクティング (bisecting) N-アセチルグルコサミン (GlcNAc) 構造を形成する能力を有する宿主細胞中で抗HM1.24抗体を発現させる必要がある。そして、そのためには、目的とする抗HM1.24抗体コードする遺伝子がクローニングされなければならない。そして、クローニングされた遺伝子によりコードされた抗HM1.24抗体としては、モノクローナル抗体、可変領域がマウスなどのヒト以外の動物に由来し、不変領域がヒトの抗体に由来するキメラ抗体、可変領域中の相補性決定領域のみがマウスなどのヒト以外の動物の抗体に由来し、それ以外の抗体部分はヒト抗体に由来するヒト型化抗体などが上げられる。

【0013】

WO 98/4580の記載から明らかな通り、モノクローナル抗HM1.24抗体を産生するハイブリドーマは既に樹立されており、このハイブリドーマは、独立行政法人産業技術総合研究所特許微生物寄託センター（茨城県東1丁目1番地1中央第6）に、平成7年9月14日に、FERM BP-5233として寄託されている。また、このハイブリドーマから、軽鎖可変領域（L鎖V領域）をコードするDNA及び重鎖可変領域（H鎖V領域）をコードするDNAがクローニングされ、そしてこれらのDNAを含むプラスミドを収容した大腸菌が、それぞれ、*Escherichia coli* DH5 α (pUC19-1.24L-g κ) (FERM BP-5646) 及び *Escherichia coli* DH5 α (pUC19-1.24H-g γ 1) (FERM BP-5644) として、独立行政法人産業技術総合研究所特許微生物寄託センター（茨城県東1丁目1番地1中央第6）に寄託されている。

【0014】

さらに、上にクローニングしたL鎖V領域をコードするDNA及びH鎖V領域をコードするDNAから、キメラ抗HM1.24抗体及びヒト化抗HM1.24抗体が作成された。ヒト化抗体については、WO 98/4580の第37頁～第40頁の表1～表4に示される

ように、ヒト化抗体のL鎖についてはバージョンa及びbが作製され、H鎖については、バージョンa～sが作製され、これらを含み合わせたヒト型化抗体の抗原結合活性の測定の結果、L鎖バージョンaとH鎖バージョンe又はsとの組合わせから成るヒト化抗体が強力な抗原結合活性を有することが確認された。

【0015】

従って、本発明においては、上に引用したW0 98/4580に記載されている種々のモノクローナル抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体などを使用することができる。しかしながら、上記の抗体のみならず、HM1.24に対する他のモノクローナル抗体に由来するキメラ抗体、モノクローナル抗体などを使用することもできる。その場合、これらの調製方法としては、例えばW0 98/4580に記載されている方法を用いることができる。

【0016】

HM1.24抗体に結合する糖鎖には、抗体分子のアスパラギンの側鎖のN原子に結合するN-グリコシド結合糖鎖と、抗体分子のセリン又はスレオニンの側鎖ヒドロキシル基に結合するO-グリコシル結合糖鎖とがあり、本発明においてフコースの存否が問題となるのはN-グリコシル結合糖鎖である。このN-グリコシル結合糖鎖は、図5及び図6に示すごとく、1個のマンノース(Man)と2個のN-アセチルグルコサミン(GlcNAc)が $\beta 1,4$ 結合で結合した基本構造(コア)「-Man $\beta 1-4$ GlcNAc $\beta 1-4$ GlcNAc-」を有し、この構造の右のGlcNAcを還元末端と称し、左側のManを非還元末端と称する。フコース(Fuc)が結合している場合、これは主として、還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位とフコースの1位とが α 結合している。

【0017】

本発明の一つの態様によれば、抗HM1.24抗体は上記のフコースを含まない糖鎖を有する。抗体分子が複数のN-グリコシル糖鎖を有する場合、少なくとも1個の糖鎖は上記のフコースを有しない。このような、フコースを含まない糖鎖を有する抗体は、当該抗体を、糖鎖へのフコース付加能を欠失した細胞、すなわち、フコース転移活性を有しないか又はこの活性が低い宿主中で発現させれば良い。

【0018】

本発明においては、フコース転移活性を有しないか又はこの活性が低い任意の宿主を用いることができるが、具体例として、ラットミエローマYB2/3HL.P2.G11.16Ag.20細胞（YB2/0細胞と略される）（ATCC CRL 1662として保存されている）が挙げられる。本発明で用いることができるその他の細胞としては、例えば、FTVI IIノックアウトCHO細胞(WO 02/31140)、Lec13 細胞(W003/035835)、フコーストランスporter欠損細胞（特願2003-174006、特願2003-282081、特願2003-174010、特願2003-282102）を挙げることができる。

【0019】

本発明のもう一つの態様によれば、本発明の抗HM1.24抗体は、バイセクティング (bisecting) N-アセチルグルコサミンを有する糖鎖を有する。N-グリコシル結合糖鎖は前記の如き基本構造（コア）を有し、その非還元末端には、図5に示すごとく、マンノースを含む2個の鎖が $\alpha 1,6$ 結合及び $\alpha 1,3$ 結合により結合している。他方、図6に示す糖鎖においては、基本構造（コア）の非還元末端に、前記2個の糖鎖のほかに、1個のN-アセチルグルコサミン (GlcNAc) が $\beta 1,4$ 結合により結合している。このN-アセチルグルコサミン (GlcNAc) が、「バイセクテングN-アセチルグルコサミン」である。

【0020】

バイセクティングN-アセチルグルコサミンを有する糖鎖は、O-グリコシル結合糖鎖又はN-グリコシル結合糖鎖であり、N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼIII (GnTIII) により、N-アセチルグルコサミンを糖鎖に転移させることにより形成される。この酵素をコードする遺伝子は既にクローニングされており、そのアミノ酸配列及びそれをコードするDNAの塩基配列は記載されている (NCBIデータベース (ACCESSION D13789))。また、このDNAは、上記の配列情報に基づいてPCR法など、常法に従って、クローニングすることができる。

【0021】

GnTIII をコードするDNAを用いて、バイセクティングN-アセチルグルコサミンを有する糖鎖を形成するには、このDNAを含んでなる発現ベクターにより、HM1.24抗体を産生する宿主細胞を形質転換すればよい。すなわち、GnTIII をコード

するDNAを含んで成る発現ベクターと抗HM1.24抗体をコードするDNAを含んで成る発現ベクターとにより、宿主細胞を形質転換し、これを培養すればよい。

【0022】

本発明の第三の態様によれば、本発明の抗HM1.24抗体は、 α -1,6コアーフコース (α -1,6core fucose) を有しない糖鎖とバイセクティングN-アセチルグルコサミンを有する糖鎖の両方を有する。このタイプの抗体を製造するには、GnTII をコードするDNAを含んで成る発現ベクターと抗HM1.24抗体をコードするDNAを含んで成る発現ベクターとにより、 α -1,6コアーフコースを有する糖鎖を形成する活性を有しないか又はこの活性が弱い宿主細胞、例えばYB2/O細胞、を形質転換し、これを培養すればよい。

【0023】

宿主細胞の形質転換方法、培養方法、及び培養物からの抗体の単離・精製方法は、常法に従って行うことができる。

【0024】

【発明の効果】

本発明によれば、高いADCC活性を有する抗HM1.24抗体を製造することができる。

【0025】

【実施例】

次に、実施例により、本願発明を更に具体的に説明する。

実施例 1. ラットミエローマYB2/Oでのヒト化抗ヒトHM1.24抗体の発現

10 μ gのヒト化抗ヒトHM1.24抗体発現ベクター (AHi/N5KG1V-lark, Barnett, R. S. et al. Antibody Production in Chinese Hamster Ovary Cells Using an Impaired Selectable Marker. In: Wang, H.Y. & Imanaka, T. (eds) ACS Symposium Series Vol 604:Antibody Expression and Engineering, 27, 1995, WO 98/4580) を2 \times 10⁶/0.6 mL PBS(-)のYB2/O (ATCC CRT-1662) へ、エレクトロポレーション法で1.5kV, 25 μ Fの条件で導入した。培養は5% CO₂インキュベーター内で37℃で行った。

【0026】

10% FCSを含むRPMI1640培地 (Gibco社) に400 μ g/mL Geneticinを加えて選択した後、50 nM MTX, 100 nM MTX, 200nM MTXと順次MTX濃度をあげ、遺伝子増幅を行った。また、96ウェルプレート (Falcon社) に200nM MTX、400 μ g/mL Geneticinを含む10% FCS/RPMI1640中、0.5 cells / 100 μ L / wellで蒔きこみ、限界希釈法にて細胞のクローニングを行った。

ヒト化抗ヒトHM1.24抗体遺伝子を導入したYB2/0細胞の培養上清は実施例.2で示すELISAにより定量した。

【0027】

実施例 2. ヒト化抗HM1.24抗体の定量(ELISA法)

96-ウェルELISA用プレート (Nunc社製) にコート緩衝液(100mmol/L 炭酸水素ナトリウム, pH9.6)で100ng/ml程度に希釈した可溶性HM1.24抗原を100 μ Lずつ添加し、4℃で1晩以上反応させた。反応後、1% BSA-PBSを200 μ L/ウェルで加え室温で約2時間放置し、作製したプレートは4℃で保存した。1%BAS-PBSを転倒除去した後、各wellをTween-PBSで洗浄した。

【0028】

適宜希釈したヒト化抗HM1.24抗体標準液又はサンプル溶液と100ng/mLに希釈したビオチン標識ヒト化抗HM1.24抗体を1:1で混ぜた後、100 μ L/wellで分注した。室温で、約1時間反応させた後、各ウェルをTween-PBSで洗浄した。アビジン標識HRPを各ウェルに添加し、室温で15分以上反応させ、TMB liquid(Sigma社製)を100 μ L/ウェルで加え、2 mol/L硫酸を50 μ L/ウェル加えることにより反応を止めた後、450nmの吸光度を測定した。ヒト化抗HM1.24抗体標準液の濃度-吸光度の検量線から、サンプル溶液のヒト化HM1.24抗体濃度を算出した。

【0029】

実施例 3. YB2/0で発現させたヒト化抗ヒトHM1.24抗体の精製

ヒト化抗ヒトHM1.24抗体の発現が確認された細胞は、1700cm²のローラーボトル (CORNING社) で拡大培養を行った。すなわち1×10⁹個のヒト化抗ヒトHM1.24抗体発現YB2/0細胞を400mLの200nM MTX、400 μ g/mL ゲンタマイシンを含む10% FCS/RPMI1640培地で(2.5rpm)でコンフルエントになるまで培養した。その後、培養上清の回収用にFCSをPBS(-)で平衡化したrProteinA FF(AmershamPharmacia社)

を予め素通りさせることでウシ由来IgGを除き (FCS(-))、このFCS(-)を用いた200nM MTX、400 μ g/mL ゲンタマイシンを含む10%FCS(-)/RPMI1640培地で3~4日間培養した。

【0030】

培養上清は0.22 μ mフィルター処理した後、rProteinA FF (PBS/PBS-クエン酸:リニアグラジエント溶出)およびSource15S (20mM酢酸、0-0.5mM NaCl:リニアグラジエント溶出)で精製した。精製したヒト化抗ヒトHM1.24抗体はHM1.24抗体-YBと名付けた(図1)。

【0031】

実施例 4. HM1.24抗原(BST-2)を発現するCHO細胞の作製

HM1.24抗原蛋白質を発現するCHO細胞を次のようにして作製した(Ohtomo T. et al., Biochemical and Biophysical Research Communications 258(1999), 583-591)。即ち、DHFRを欠損したCHO細胞株に、HM1.24抗原をコードする発現ベクターp3.19 (上記文献)を導入し、500 μ g/mlのG418で選択し、さらに限界希釈法によりHM26、HM31、HM21及びHM36の4つの細胞株を得た。細胞表面上のHM1.24抗原の発現数は特願2001-115889に記された方法にてフローサイトメトリーで測定したところ、それぞれ細胞あたり 3.8×10^3 、 2.2×10^4 、 2.2×10^4 及び 1.8×10^5 個であった。

【0032】

実施例 5. ヒト末梢血由来PBMCを用いたADCC活性の測定

(1) ヒトPBMC溶液の調製

健常人よりヘパリン加採血した末梢血を、PBS(-)で2倍に希釈し、Ficoll-PaqueTM PLUS (Amersham Pharmacia Biotech AB)に重層した。これを遠心 (500 \times g、30分間、20 $^{\circ}$ C) した後、単核球画分である中間層を分取した。3回洗浄後、10% FBS/RPMIに懸濁し、ヒトPBMC溶液とした。

【0033】

(2) 標的細胞溶液の調製

実施例(A)に示したHM1.24抗原(BST-2)を発現するCHO細胞は、細胞剥離緩衝液 (Invitrogen Corp)を用いてディッシュから剥離し、10%FBS/RPMI 200 μ Lに浮遊し

、5.55MBqのChromium-51を加え、5%炭酸ガスインキュベータ中37℃1時間培養した。この細胞を3回洗浄した後、10%FBS-RPMI1640培地中個々の細胞濃度に調製し、標的細胞溶液とした。

【0034】

(3) クロム遊離試験 (ADCC活性)

標的細胞溶液を96ウェルU底プレートに50 μ Lずつ分注し、各濃度に調製した抗体溶液50 μ Lを添加し、氷上で1時間反応させた後に、ヒトPBMC溶液100 μ Lを加え、5%炭酸ガスインキュベータ中37℃4時間培養し、培養後培養上清100 μ L中の放射活性をガンマカウンターで測定した。下式により特異的クロム遊離率を求めた。

【0035】

特異的クロム遊離率(%) = (A-C) \times 100 / (B-C)

Aは各ウェルにおける放射活性(cpm)の平均値、Bは標的細胞浮遊液を50 μ L、10%NP-40水溶液 (Nonidet (商標) P-40, ナカライテスク社製) を20 μ L、10%FBS/RPMI培地を130 μ L添加したウェルにおける放射活性(cpm)の平均値、Cは標的細胞浮遊液を50 μ L、10%FBS/RPMI培地を150 μ L添加したウェルにおける放射活性(cpm)の平均値を示す。

【0036】

実施例 6. β ガラクトシダーゼ安定発現CHO細胞株を用いたADCC活性測定法

エフェクター細胞として健常人の末梢血より比重遠心法で分離した単核球を用いた。すなわち、健常人の末梢血に等量のPBSを加え、Ficoll-PaquePLUS (Pharmacia) に積層し、500gで30分間遠心した。単核球相を分取し、10%FCSを含むRPMI 1640で3回洗浄後、10%FCSを含む α -MEMで細胞数が 5×10^6 / mLになるように調製した。

【0037】

トリプシン-EDTAで剥がし、10%FCSを含む α -MEMで懸濁した 2×10^5 細胞/mLの β ガラクトシダーゼ安定発現CHO#30細胞株50 μ Lと、様々な濃度の抗HM1.24抗体50 μ Lを96ウェルU底プレートに加え、4℃で15分間反応させた。ついでエフェクター細胞100 μ Lを加え、37℃で4時間培養した。培養後、20 μ Lの培養上清

を採取し、 β ガラクトシダーゼ活性を測定した。最大遊離酵素量はGalactone-starアッセイキットの細胞溶解緩衝液により遊離される酵素量とした。

【0038】

細胞傷害活性は、

$$\text{細胞傷害活性 (\%)} = (A-C) \times 100 / (B-C)$$

(% β -ガラクトシダーゼ)

として計算した。ここでAは抗体存在下において遊離された β ガラクトシダーゼ活性(RLU/sec)、Bは細胞溶解緩衝液により遊離された β ガラクトシダーゼ活性(RLU/sec)、Cは抗体を含まず培養液のみで遊離された β ガラクトシダーゼ活性(RLU/sec)を示す。

【0039】

実施例 7. YB2/0由来ヒト化抗ヒトHM1.24抗体のADCC活性の測定

YB2/0で発現させたHM1.24抗体 (HM1.24抗体-YB) のADCC活性を実施例(B)の方法にて測定した結果を図2～図3に示した。図2に示したように、いずれの標的細胞においても、HM1.24抗体-YBは、DG44 (DHFR欠損CHO細胞: Urlaub, G. et al. (1986) Effect of Gamma Rays at the Dihydrofolate Reductase Locus: Deletions and Inversions. Somatic Cell and Molecular Genetics, 12: 555, 1986) で産生したHM1.24抗体 (HM1.24抗体-DG44) よりも高いADCC活性を示した。

【0040】

具体的には、より低濃度でADCC活性の誘導が認められ、最大のADCC活性にも向上が見られた。特にHM1.24抗原の発現数が少ない標的細胞HM26, HM31を用いた場合、HM1.24抗体-DG44では非常に低いADCC活性しか示さなかったのに対してHM1.24抗体-YBでは高いADCC活性が出現した。また、図3に示したように、標的細胞数に対するPBMC数の割合(E/T比)が25の時のみならず、E/T比が5の場合もHM1.24抗体-YBはHM1.24抗体-DG44よりも高いADCC活性を示した。

【0041】

実施例 8. 糖鎖の解析

1. 2-アミノピリジン標識糖鎖(PA化糖鎖)の調製

本発明のYB2/0由来抗体、及び対照試料としてCHO由来の抗体に、N-グリコシダ

ーゼ F(Roche)を作用させ、糖鎖を蛋白質から遊離させた(Weitzhandler M. et al., Journal of Pharmaceutical Sciences 83:12(1994), 1670-1675)。セルロースカートリッジ(TAKARA製)を用いた固相抽出(Shimizu Y. et al., Carbohydrate Research 332(2001), 381-388)により脱塩した後濃縮乾固し、2-アミノピリジンによる蛍光標識を行った(Kondo A. et al., Agricultural and Biological Chemistry 54:8(1990), 2169-2170)。得られたPA化糖鎖を、セルロースカートリッジを用いた固相抽出により脱試薬した後遠心濃縮し、精製PA化糖鎖とした。

【0042】

2. 精製PA化糖鎖の逆相HPLCによる分析

上記実施例8の1項の方法で、本発明のYB2/0由来抗体、及び対照試料としてCHO由来の抗体についてPA化糖鎖の調製を行った後、ODSカラム(TAKARA製 Palpak Type R)による逆相HPLC分析を行い、クロマトグラムを比較した。CHO由来抗体の糖鎖に比較して、YB2/0由来抗体の糖鎖は、20分から35分までに溶出するフコース無しと推定される糖鎖(A-D)のピーク増加が確認された(図4)。

【0043】

3. 精製PA化糖鎖の二次元マッピングによる分析

上記実施例8の1項の方法で、本発明のYB2/0由来抗体についてPA化糖鎖の調製を行った後、ODSカラムによる逆相HPLC分析及びアミンカラム(TAKARA製 Palpak Type N)による順相HPLC分析を組み合わせた、二次元マッピングを実施した。具体的には、アミンカラムによる順相HPLCで、精製PA化糖鎖のメインピークを粗分画し、各分画を逆相HPLCにて分析した。

【0044】

各糖鎖の同定は、PA化糖鎖標準品(TAKARA製、ホーネン製、生化学工業製; 図5のK, O, Pを除く)とのHPLCにおける溶出位置の比較及びTOF-MSによる分子量確認にて行った。同定された各糖鎖の相対比を第1表に示す(J, Kの区別及びN, Oの区別は本実施例においては行っていない)。また、表1に示す糖鎖の構造を図5及び図6に示す。この結果本発明のYB2/0由来抗体は、フコースの無い糖鎖が30%以上存在し、且つバイセクテイングGlcNAcを持つ糖鎖が存在することが確認された。

【0045】

【表1】

表1			
糖鎖	グループ	各糖鎖相対比	各グループ相対比
A	-Fuc, -Bisecting GlcNAc	17.7%	33.5%
B		9.9%	
C		3.9%	
D		1.9%	
E	+Fuc, -Bisecting GlcNAc	22.9%	55.2%
F		21.4%	
G		5.5%	
H		5.4%	
I	-Fuc, +Bisecting GlcNAc	2.0%	3.3%
J (K)		1.3%	
M	+Fuc, +Bisecting GlcNAc	3.7%	8.0%
N (O)		4.2%	

【0046】

実施例9. ヒトGnTIII発現ベクターの作製

ヒトGnTIII遺伝子配列はNCBIデータベース (ACCESSION D13789) より入手した。配列はGENETYX-SV/RCで解析し、繰返し配列が多いことから、PCRによる増幅を容易にする目的で、サイレント変異を複数箇所導入したプライマーをデザインし、PCRによる合成にて取得した。PCRにはKODポリメラーゼ (TOYOBO社) を用い、塩基番号801から870までの二本鎖を最初の鋳型とし、下に示すプライマーを用いて順次、PCRを行った。下記のプライマー配列において、大文字はサイレント変異を導入した塩基を示す。また、数字は翻訳開始部位からの何塩基目かを示す。図7は、GnTIII 遺伝子に対する各プライマーの位置を示す。

【0047】

【化 1】

化1

フォワードプライマー

Initial (BamHI) : TTCTCGAGatgagagctacaagctctttcttoatgttc

1-97: atgagagcgtacaagctctttctcatgttctgtatggcggcgtggcctcatctctcttctcctgcaattcttcaagaccctgtcctatgtcaccttcc

78-177:cctgtcctatgtcacottcccAogaggaactgggcctcccttagccctaaccctgggtgtccagctttttctgggaacaatgccccgggtcacgcccagggccagc

158-259 : cgggtcaagcccaaggcgaagccctgagccagagagcccctgacctgactgctgctaaccacacttactccactcgccccctgctgcagccgctgcccgcagccagcgg

239-331: agccgcctgccgccaggaagagcggccgagagaggtccacgggtggatctggctgcccgagagacacacggagtattcgtgcgcacaaagg

312-409: gtatttctgtgcacccaaggctggaggagctgattcgaacccggcaccgaagatgctggagagaccgcctccggagagaccgcctgagag

390-472: AccggaggagaaagcctgagggggccaaagAtcctgggCcggcgAccacccggtaacctgagcgccggggagcgcaagg

[illegible]

535-618: agctgcggcgtgccactgtgggtgcagtaTtccaaactgccTaccaggagcggotggTgccaggagggTgcggcgccgctg

598-696: agggaggtgccggccggcgtcaTaaTatcaacgtcaaacagagttcgaactgctggacgtggcgttccacaggagctggggcggacgtgggtggacggc

337-777: tggggacagtggtagagcctttgtgtgtggagtcgaacttcagggttatggggagccgcgcgcgtcaagttccgggagatgctgacaaatggcacc

758-820: agatgctgaccaaattggcaaccttcggtacatcgcacaaggctgttatgtttcctggacc

3301-870: gctctatgtcttcctggaccacttccTccTggAggAagAcaAgaTggAtggatcgccgagatactg

【化2】

化2

リバーズプライマー

End(HindIII) :TTTAAGGTTActagaacttcggotcgtccagtttTcc

1596-1488: ctagaacttcggotcgtccagtttTccogAgcAggocggTcttccTccAgggacccctgtagggccctcctggggctcctggtagggggttctgctc

1508-1407: ggcctcctggtagggggttgccagAaggtagtgaggaaacgggtcgtagattcttcacagagtaacttgggccggcmtacatgtctgctgggggtctctgcagggccgggtac

1427-1324: ctggggggtctgcagggcggggtactcTtgctgggtgcgctgtagaacacagcccccgggtgctggggtacagggccggcgggatgtagttcagggtcocggcttgctcctgtagtcaccc

1344-1244: ccggcttgcttcctgtagtcacccacagcgttggggaagtcgcattcttgggccgggacacagagcttgagagttagatggccctcggggccgttgaaagcaacagggagcagtagtgcc

1264-1162: tggaaagccacagggagcagtgctgcagccggccggcgaagtgAaggggggctggccaaagcagcaactgcacacagggatctgtTccgggtgggggtctctacatactgctctgaagttggg

1182-1084: ctcataactgtctgaaagttagggcaatgggtagtaTtgccggcgccggcgaggggagtgccgctccagccccatacaactgcctggcagcatgctccaaocgtagcagcc

1103-1004: agcatgctccaaocgtagcagccctgaaacacactccaggggtgcocggTgctctccaaAaagaaTccgtagagcagcagctggcagatgtagggaaaggccagggccctcgg

1023-922: gtaggaagggcgaaagggtctgggtccaaagcaactcgtagaagcttgaggaaGagggacggcctcaaggggccctggggtatctcgtccggcactcgtccaaatgtagaagagctcgtc

941-851: tcaatgtagtagaacgctcgtccgggcocggcaggggtgcccagccggccctgggttagggaaagggtgcccagggtagtctgctgggctggatcc

870-801: caggtaggtcgtcggcgagtcceaTccAtcTgtTcgTccAagAggAaagtggtccagggaagacatagaggc

380-300 gggcgTctctccagcaacttggtgcccgggttgaaagcagagcggccTccAgcccttggtgcccagccagaaataactcgggtgggtctcc

320-241 acgaaataactcgggtggtctcggggcagcaaccaaagtcaccccggtagagctccctcgggcccggcccttgctggggccggcagccggg

Bam-359 TTtggaTccgttgcccccctcaaggcttctctctccggTcgtcccgAgggcggTctctccagcagatcttggg

【0049】

必要に応じて増幅断片をアガロースゲル電気泳動して、目的断片をゲルから切

り出して精製したものを次のPCRの鋳型とした。最終的にPCRのみで全長を増幅することが困難であったため、予めプライマー内にサイレント変異として挿入しておいたBamHI部位を用いて、その前後の断片を増幅後に連結することにより、全長ヒトGnTIII遺伝子を取得した。図11～図15に、生来型ヒトGnTIII をコードする塩基配列（配列番号：28）（GnTIII ori.nuc）と変異型ヒトGnTIII をコードする塩基配列（配列番号：29）（GnTIII mut.nuc）と対比を示す。図中、星印は、両配列の対応する塩基が同一であることを示す。

ヒトGnTIIIは、pcDNA3.1(Hygro-)（Invitrogen社）のXhoI/HindIII部位に組込み、配列を確認した。

【0050】

実施例10. HM1.24抗体-DG44発現CHO細胞でのGnTIIIの発現

上記実施例.9で得られた10 μ gのGnTIII/pcDNA3.1(Hygro-)をHM1.24抗体-DG44発現CHO株にエレクトロポレーション法で1.5kV, 25 μ Fの条件で導入した。培養は5% CO₂インキュベーター内で37℃で行った。96ウェルプレート（Falcon社）に、10% FCSを含むIMDM培地（Gibco社）を用いて、10細胞/100 μ L/wellで蒔きこみ、2日間培養した。400 μ g/mLハイグロマイシンを含む10% FCS-IMDM培地に代え、1～2週間、細胞の選択を行った。ハイグロマイシン耐性コロニーが出現し、増殖の認められた細胞の培養上清を回収し、ヒト化抗ヒトHM1.24抗体抗体量を実施例.2のELISA法により測定した。

【0051】

実施例11. GnTIII発現ヒト化抗ヒトHM1.24抗体産生CHO細胞のADCC活性によるスクリーニング

GnTIIIを強制的に発現させたヒト化抗ヒトHM1.24抗体産生細胞（クローンNo.1～31）に由来する化抗ヒトHM1.24抗体及びHM1.24抗体-DG44の培養液を抗体濃度400ng/mlに培地を用いて希釈し、実施例6に示した方法を用いてADCC活性を測定し比較した（図8）。

最終的にADCC活性とヒト化抗ヒトHM1.24抗体発現量および増殖速度を考慮してスクリーニングを行い、クローンNo.6（57B2）を得た。

【0052】

実施例12. GnTIII発現CHO細胞由来ヒト化抗ヒトHM1.24抗体のADCC活性の測定

GnTIIIを強制的に発現させたヒト化抗ヒトHM1.24抗体産生細胞に由来するヒト化抗ヒトHM1.24抗体のADCC活性を実施例(B)の方法にて測定した結果を図9に示した。クローンNo.3, No.6 (57B2) とHM1.24抗体-DG44を比較した結果、いずれのクローンもHM1.24抗体-DG44よりも高いADCC活性を示した。

【0053】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Chugai Seiyaku Kabushiki Kaisha
<120> Anti HM1.24 Antibody With Modified Sugar Chains
<130> 1033985
<160> 29
<210> 1
<211>
<221> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<221>
<222>
<223> Foward primer Initial (BamHI)
<400> 1

tttctcgaga tgagacgcta caagctcttt ctcatgttc

39

<210> 2
<211>
<221> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<221>
<222>

<223> Foward primer 1-97

<400> 2

atgagacgct acaagctctt tctcatgttc tgtatggccg gcctgtgcct catctccttc 60

ctgcacttct tcaagaccct gtcctatgtc accttcc 97

<210> 3

<211>

<221> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221>

<222>

<223> Foward primer 78-177

<400> 3

cctgtcctat gtcaccttcc cacgagaact ggcctccctc agccctaacc tggtgtccag 60

ctttttctgg aacaatgccc cggtcacgcc ccaggccagc 100

<210> 4

<211>

<221> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221>

<222>

<223> Foward primer 158-259

<400> 4

cggtcacgcc ccaggccagc cctgagccag gaggccctga cctgctgcgt accccactct 60

actcccactc gcccctgctg cagccgctgc cgcccagcaa gg 102

<210> 5

<211>

<221> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221>

<222>

<223> Foward primer 239-331

<400> 5

agccgctgcc gccagcaag gcggccgagg agctccaccg ggtggacttg gtgctgcccg 60

aggacaccac cgagtatttc gtgcgcacca agg 93

<210> 6

<211>

<221> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221>

<222>

<223> Foward primer 312-409

<400> 6

gtatttcgtg cgcaccaagg ctggaggcgt ctgcttcaaa cccggcacca agatgctgga 60

gagaccgcct ccgggacgac cggaggagaa gcctgagg 98

<210> 7

<211>

<221> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221>

<222>

<223> Foward primer 390-472

<400> 7

accggaggag aagcctgagg gggccaacgg atcctcggcc cggcgaccac cccggtacct 60

cctgagcgcc cgggagcgca cgg

83

<210> 8

<211>

<221> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221>

<222>

<223> Foward primer 453-556

<400> 8

gagcgcccgg gagcgcacgg ggggccgagg tgcacgacgc aagtgggtgg agtgcgtgtg 60

tctgcccgga tggcacggac ccagctgcgg cgtgcccact gtgg 104

<210> 9

<211>

<221> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221>

<222>

<223> Foward primer 535-618

<400> 9

agctgcggcg tgcccactgt ggtgcagtat tccaacctgc ctaccaagga gcggctggtg 60

cccagggagg tgccgcgccg cgtc 84

<210> 10

<211>

<221> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221>

<222>

<223> Foward primer 598-696

<400> 10

agggaggtgc cgcgccgct cattaatgct atcaacgtca accacgagtt cgacctgctg 60

gacgtgcgct tccacgagct gggcgacgtg gtggacgcc 99

<210> 11

<211>

<221> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221>

<222>

<223> Foward primer 677-777

<400> 11

tgggcgacgt ggtggacgcc tttgtggtgt gcgagtcaa cttcacggct tatggggagc 60

cgcggccgct caagttccgg gagatgctga ccaatggcac c 101

<210> 12

<211>

<221> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221>

<222>

<223> Foward primer 758-820

<400> 12

agatgctgac caatggcacc ttcgagtaca tccgccacaa ggtgctctat gtcttcctgg 60

acc 63

<210> 13

<211>

<221> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221>

<222>

<223> Foward primer 801-870

<400> 13

gctctatgtc ttcttgacc actttcctcc tggaggacga caagatggat ggatcgccga 60

cgactacctg 70

<210> 14

<211>

<221> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221>

<222>

<223> Reverse primer End(HindIII)

<400> 14

tttaagctta ctagacttcc gcctcgcca gttttcc 37

<210> 15

<211>

<221> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221>

<222>

<223> Reverse primer 1596-1488

<400> 15

ctagacttcc gcctcgcca gttttcccg agcaggcggc cttccttcag gaccctgtg 60

gcgccatcct cccgcagccg tgctcctggg ctcttggttag gggttgtcc 109

<210> 16

<211>

<221> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221>

<222>

<223> Reverse primer 1508-1407

<400> 16

ggctcctggg aggggttgtc cagaaggtag tggaaccggg ctagttctt cagcaggtac 60

ttgggcgcac acatgtgctc gctgggggtct gcaggcgggt ac 102

<210> 17

<211>

<221> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221>

<222>

<223> Reverse primer 1427-1324

<400> 17

ctgggggtctg caggcgggta ctcttgctgc gtgccgtcga accagccccc ggtgcggatc 60

aggccgcgga ttagttcag gtcccgttg tcctcgtagt cacc 104

<210> 18

<211>

<221> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221>

<222>

<223> Reverse primer 1344-1244

<400> 18

ccgcttgtcc tcgtagtcac cccagcgtgg gaagtcgcca ttctgggcgg acacgagctt 60

gaagtagatg ccctcgggcg tgaagcacca ggagcagtgc c 101

<210> 19

<211>

<221> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221>

<222>

<223> Reverse primer 1264-1162

<400> 19

tgaagcacca ggagcagtgc cagccggcga agtgaagggg gctgcccagc gaccactgca 60

ccaggatgtg tccggtgcgg ttctcatact gtctgaagtt gg 102

<210> 20

<211>

<221> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221>

<222>

<223> Reverse primer 1182-1084

<400> 20

ctcatactgt ctgaagttgg gcatggtgta gtattggcgg cggcgcaggc ggatgccgtc 60

cagcccatat actgcctgca gcatgtccac cgtgcagcc 99

<210> 21

<211>

<221> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221>

<222>

<223> Reverse primer 1103-1004

<400> 21

agcatgtcca ccgtgcagcc tgacaccacc tccaggggtgc ccggttgctt ccaaaagaat 60

ccgtagagcg acgtgcgcat gtggaaggcg aagggtcgg 100

<210> 22

<211>

<221> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221>

<222>

<223> Reverse primer 1023-922

<400> 22

gtggaaggcg aagggtcgg tccagccatc gtagagcttg aggaacagga cgccgtcacg 60

ggccgggatc tcgtccgcat cgtcaatgat gaagacgtcg tc 102

<210> 23

<211>

<221> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221>

<222>

<223> Reverse primer 941-851

<400> 23

tcaatgatga agacgtcgtc gggccgcagg ttgcgcagcc gcgagacgcc gtcctgggtg 60
aggaaggtgc gcaggtagtc gtcggcgatc c 91

<210> 24

<211>

<221> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221>

<222>

<223> Reverse primer 870-801

<400> 24

caggtagtcg tcggcgatcc atccatcttg tcgtcctcca ggaggaaagt ggtccaggaa 60
gacatagagc 70

<210> 25

<211>

<221> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221>

<222>

<223> Reverse primer 380-300

<400> 25

ggcggctctt ccagcatctt ggtgccgggt ttgaagcaga cgcctccagc cttggtgcgc 60
acgaaatact cggtggtgtc c 81

<210> 26

<211>

<221> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221>

<222>

<223> Reverse primer 320-241

<400> 26

acgaaatact cgggtggtgtc ctcgggcagc accaagtcca cccggtggag ctcctcggcc 60

gccttgctgg gcggcagcgg 80

<210> 27

<211>

<221> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221>

<222>

<223> Reverse primer Bam-359

<400> 27

tttggatccg ttggccccct caggcttctc ctccggtcgt cccggaggcg gtctctccag 60

catcttgg 68

<210> 28

<211> 1596

<221> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Nucleotide sequence encoding human GnTIII

<400> 28

atgagacgct acaagctctt tctcatgttc tgtatggccg gcctgtgcct catctccttc 60

ctgcacttct tcaagaccct gtcctatgtc accttcccc gagaactggc ctccctcagc 120

cctaacctgg tgtccagctt tttctggaac aatgccccgg tcacgcccc ggccagcccc 180

gagccaggag gccctgacct gctgcgtacc ccactctact cccactcgcc cctgctgcag 240

ccgctgccgc ccagcaaggc ggccgaggag ctccaccggg tggacttggt gctgcccag 300

gacaccaccg agtatttcgt ggcaccaag gccggcggcg tctgcttcaa acccggcacc 360
aagatgctgg agaggccgcc cccgggacgg ccggaggaga agcctgaggg ggccaacggc 420
tcctcggccc ggcggccacc ccggtacctc ctgagcgccc gggagcgcac ggggggcccga 480
ggcggccggc gcaagtgggt ggagtgcgtg tgcctgcccg gctggcacgg acccagctgc 540
ggcgtgccc a ctgtggtgca gtactccaac ctgcccacca aggagcggct ggtgcccagg 600
gaggtgccgc gccgcgtcat caacgccatc aacgtcaacc acgagttcga cctgctggac 660
gtgcgcttcc acgagctggg cgacgtggtg gacgcctttg tgggtgtgca gtccaacttc 720
acggcttatg gggagccgcg gccgtcaag ttccgggaga tgctgaccaa tggcaccttc 780
gagtacatcc gccacaagg tctctatgtc ttcctggacc acttcccgcc cggcggccgg 840
caggacggct ggatcgccga cgactacctg cgcaccttcc tcaccagga cggcgtctcg 900
cggctgcga acctgcggc cgacgacgtc ttcattatg acgatgcgga cgagatcccg 960
gcccgtagc gcgtcctttt cctcaagctc tacgatggct ggaccgagcc cttcgccttc 1020
cacatgcga cgtcgtctta cggcttcttc tggaagcagc cgggcaccct ggaggtggtg 1080
tcaggctgca cgggtggacat gctgcaggca gtgtatgggc tggacggcat ccgcctgcgc 1140
cgccgccagt actacacat gcccaacttc agacagtatg agaaccgcac cggccacatc 1200
ctgggtgcagt ggctcgtggg cagccccctg cacttcgccg gctggcactg ctcttggtgc 1260
ttcacgccc agggcatcta cttcaagctc gtgtccgcc agaatggcga cttcccacgc 1320
tggggtgact acgaggacaa gcgggacctg aactacatcc gcggcctgat ccgcaccggg 1380
ggctggttcg acggcacgca gcaggagtac ccgcctgcag accccagcga gcacatgtat 1440
gcgccaagt acctgctgaa gaactacgac cggttccact acctgctgga caaccctac 1500
caggagccca ggagcacggc ggcgggcggg tggcgccaca ggggtcccga gggaaggccg 1560
cccgccggg gcaaaactgga cgaggcgga gtctag 1596

<210> 29

<211> 1596

<221> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221>

<222>

<223> Artificial nucleotide sequence encoding human GnTIII

<400> 29

atgagacgct acaagctctt tctcatgttc tgtatggccg gcctgtgcct catctccttc	60
ctgcacttct tcaagaccct gtcctatgtc accttcccac gagaactggc ctccctcagc	120
cctaacctgg tgtccagctt tttctggaac aatgccccgg tcacgccccca ggccagccct	180
gagccaggag gccctgacct gctgcgtacc ccaactctact cccactcgcc cctgctgcag	240
ccgctgccgc ccagcaaggc ggccgaggag ctccaccggg tggacttggg gctgcccag	300
gacaccaccg agtatttcgt gcgcaccaag gctggaggcg tctgcttcaa acccggcacc	360
aagatgctgg agagaccgcc tccgggacga ccggaggaga agcctgaggg ggccaacgga	420
tcctcggccc ggcgaccacc ccggtacctc ctgagcgccc gggagcgcac ggggggcca	480
ggtgcacgac gcaagtgggt ggagtgcgtg tgtctgcccg gatggcacgg acccagctgc	540
ggcgtgccca ctgtggtgca gtattccaac ctgcctacca aggagcggct ggtgcccagg	600
gaggtgccgc gccgcgtcat taatgctatc aacgtcaacc acgagttcga cctgctggac	660
gtgcgcttcc acgagctggg cgacgtggtg gacgcctttg tgggtgtgca gtccaacttc	720
acggcttatg gggagccgcg gccgctcaag ttccgggaga tgctgaccaa tggcaccttc	780
gagtacatcc gccacaagggt gctctatgtc ttcctggacc actttcctcc tggaggacga	840
caagatggat ggatcgccga cgactacctg cgcaccttcc tcaccagga cggcgtctcg	900
cggctgcgca acctgcggcc cgacgacgtc ttcattcattg acgatgcgga cgagatcccc	960
gcccgtgacg gcgtcctgtt cctcaagctc tacgatggct ggaccgagcc cttcgccttc	1020
cacatgcgca cgtcgctcta cggattcttt tggaagcaac cgggcaccct ggaggtggtg	1080
tcaggctgca cgggtggacat gctgcaggca gtgtatgggc tggacggcat ccgcctgcgc	1140
cgccgccaat actacaccat gcccaacttc agacagtatg agaaccgcac cggacacatc	1200
ctggtgcagt ggtcgctggg cagccccctt cacttcgccg gctggcactg ctccctggtgc	1260
ttcacgcccg agggcatcta cttaagctc gtgtccgcc agaatggcga cttcccacgc	1320
tgggggtgact acgaggacaa gcgggacctg aactacatcc gcggcctgat ccgcaccggg	1380
ggctggttcg acggcacgca gcaaggtac ccgcctgcag accccagcga gcacatgtat	1440
gcgcccgaagt acctgctgaa gaactacgac cggttccact accttctgga caaccctac	1500
caggagccca ggagcacggc tgcgggagga tggcgccaca ggggtcctga aggaagaccg	1560
cctgctcggg gaaaactgga cgaggcggaa gtctag	1596

【図面の簡単な説明】**【図 1】**

図 1 は、YB2/0 で発現させた精製ヒト化抗ヒト HM1.24 抗体の SDS-PAGE (12%T) のパターンを示す。左図：還元条件下、右図：非還元条件下。精製ヒト化抗ヒト HM1.24 抗体各 $4\mu\text{g}$ をアプライした。

【図 2】

図 2 は、HM1.24 抗体-DG44 と HM1.24 抗体-YB の各抗体濃度におけるヒト PBMC の ADCC 活性を、4 種類の HM1.24 抗原発現 CHO 細胞 (HM26, HM31, HM21, HM36) を標的細胞として、E/T ratio=25 で測定した結果である。

【図 3】

図 3 は、HM1.24 抗体-DG44 と HM1.24 抗体-YB 1mg/mL におけるヒト PBMC の ADCC 活性を、HM31 を標的細胞として、E/T ratio=1, 5, 25 で測定した結果である。

【図 4】

図 4 は、CHO 由来の抗体 (a) 及び YB2/0 由来抗体 (b) から調製した PA 化糖鎖の逆相 HPLC クロマトグラムである。産生細胞の種類により糖鎖パターンが変化し、特に YB2/0 由来抗体では、フコース無しと推定されるピーク群 (A-D) が増加していることを示している。

【図 5】

図 5 は、第 4 図と第 1 表で示した糖 A ~ H の構造を示す。

【図 6】

図 6 は、第 4 図と第 1 表で示した糖 I ~ O の構造を示す。

【図 7】

図 7 は、ヒト GnTIII cDNA の PCR による全合成に使用したプライマー配列と組合わせを示した。予めプライマーに導入した BamHI 配列の前後の PCR 断片を同部位で連結し、ヒト GnTIII cDNA 全配列を取得した。

【図 8】

図 8 は、HM1.24 抗体-DG44 及び GnTIII 発現ヒト化抗ヒト HM1.24 抗体産生株由来抗体 100ng/mL における ADCC 活性の比較。GnTIII を発現させることにより ADCC 活性が増強している抗体産生株が得られた。

【図 9】

図 9 は、HM1.24 抗体-DG44 と GnTIII 発現 CHO 細胞由来 ヒト化抗ヒト HM1.24 抗体の各抗体濃度における ヒト PBMC の ADCC 活性を、HM36 を 標的細胞として、E/T ratio = 25 で測定した結果である。

【図 10】

図 10 は、生来型 ヒト GnTIII をコードする塩基配列（配列番号：28）（GnTIII ori.nuc）と変異型 ヒト GnTIII をコードする塩基配列（配列番号：29）（GnTIII mut.nuc）と対比を示す。図中、星印は、両配列の対応する塩基が同一であることを示す。

【図 11】

図 11 は、生来型 ヒト GnTIII をコードする塩基配列（配列番号：28）（GnTIII ori.nuc）と変異型 ヒト GnTIII をコードする塩基配列（配列番号：29）（GnTIII mut.nuc）と対比を示す。図中、星印は、両配列の対応する塩基が同一であることを示す。

【図 12】

図 12 は、生来型 ヒト GnTIII をコードする塩基配列（配列番号：28）（GnTIII ori.nuc）と変異型 ヒト GnTIII をコードする塩基配列（配列番号：29）（GnTIII mut.nuc）と対比を示す。図中、星印は、両配列の対応する塩基が同一であることを示す。

【図 13】

図 13 は、生来型 ヒト GnTIII をコードする塩基配列（配列番号：28）（GnTIII ori.nuc）と変異型 ヒト GnTIII をコードする塩基配列（配列番号：29）（GnTIII mut.nuc）と対比を示す。図中、星印は、両配列の対応する塩基が同一であることを示す。

【図 14】

図 14 は、生来型 ヒト GnTIII をコードする塩基配列（配列番号：28）（GnTIII ori.nuc）と変異型 ヒト GnTIII をコードする塩基配列（配列番号：29）（GnTIII mut.nuc）と対比を示す。図中、星印は、両配列の対応する塩基が同一であることを示す。

【図 1 5】

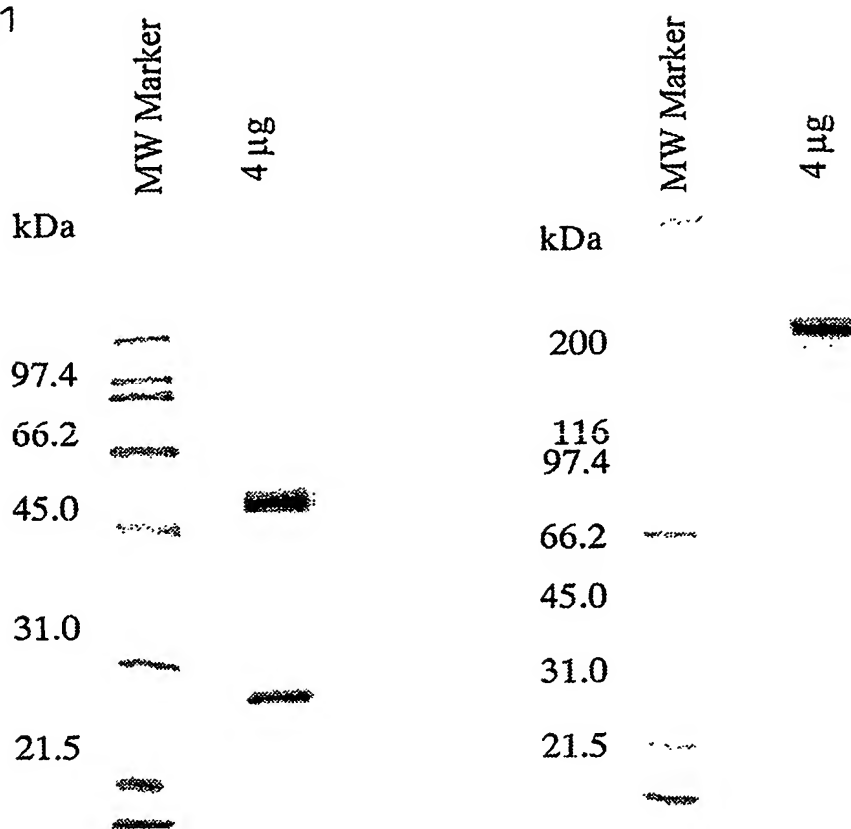
図 1 5 は、生来型ヒトGnTIII をコードする塩基配列（配列番号：28）（GnTIII ori.nuc）と変異型ヒトGnTIII をコードする塩基配列（配列番号：29）（GnTIII mut.nuc）と対比を示す。図中、星印は、両配列の対応する塩基が同一であることを示す。

【書類名】

図面

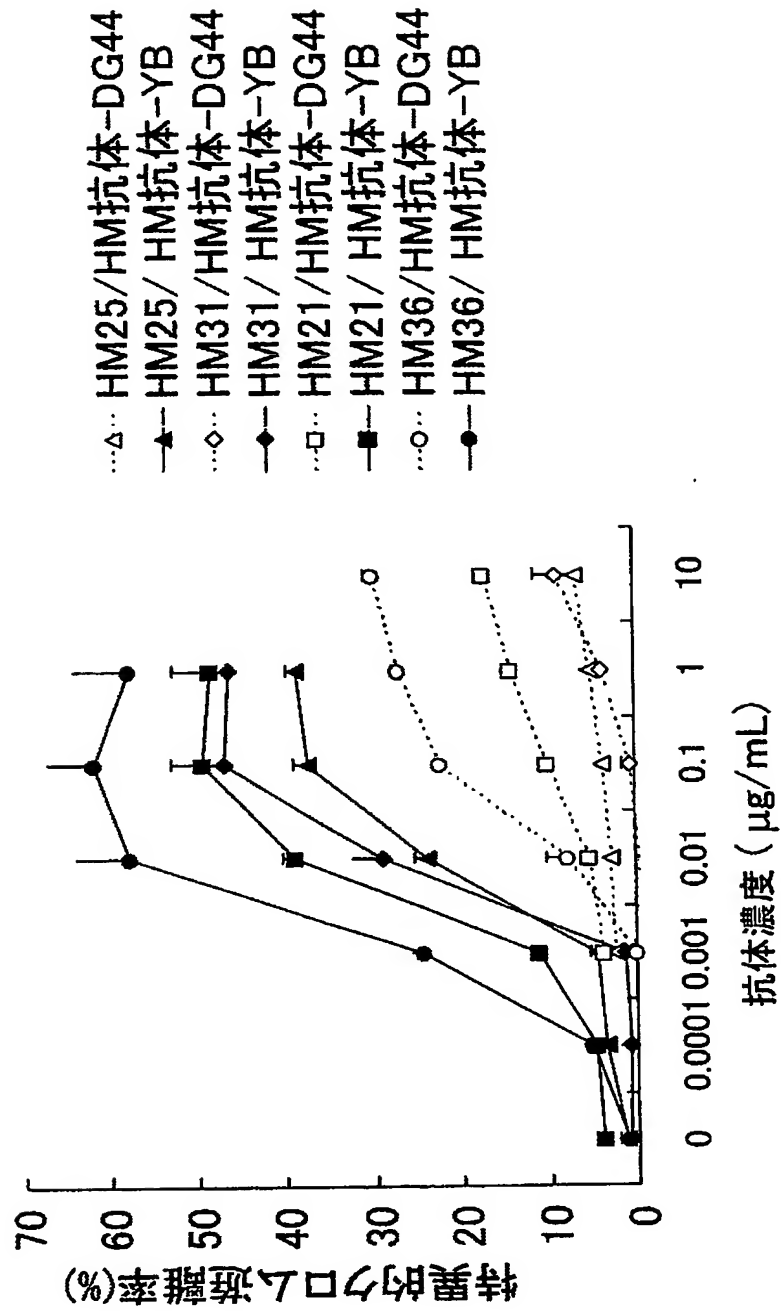
【図 1】

図1



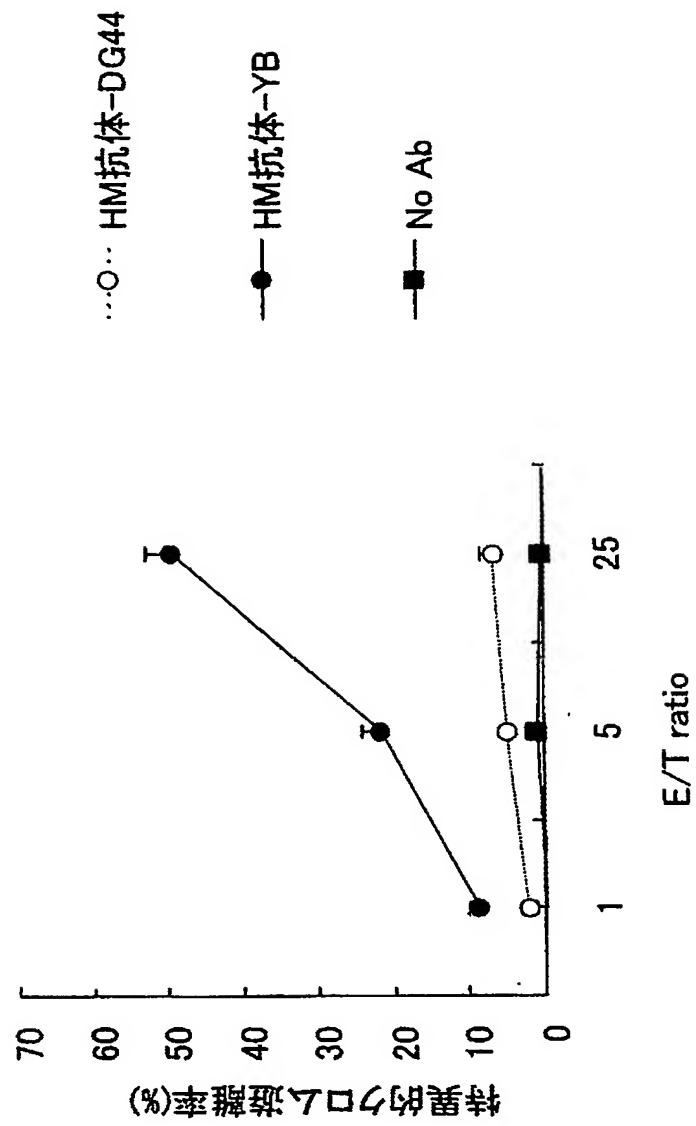
【図 2】

図 2



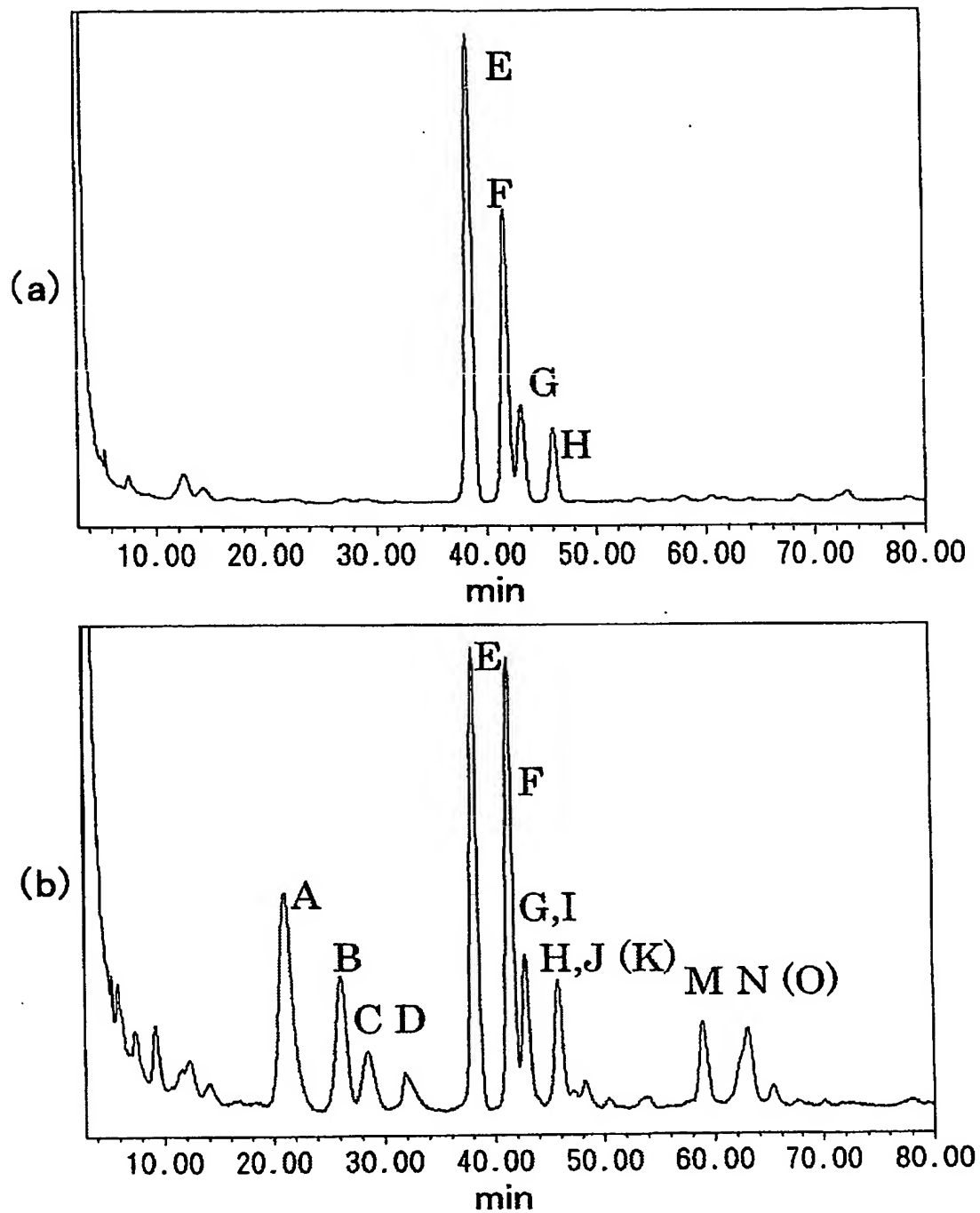
【図 3】

図 3



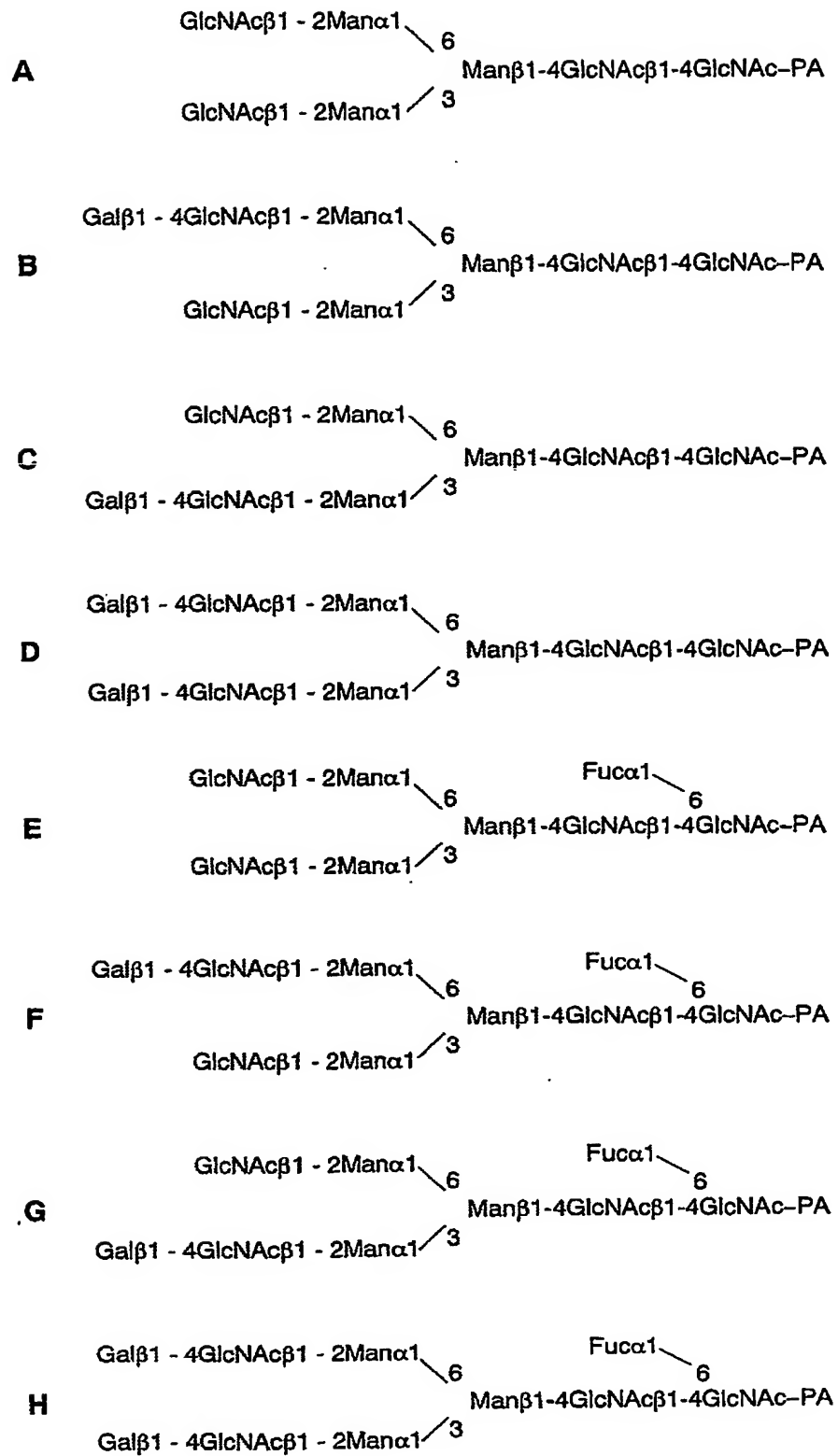
【図 4】

図 4



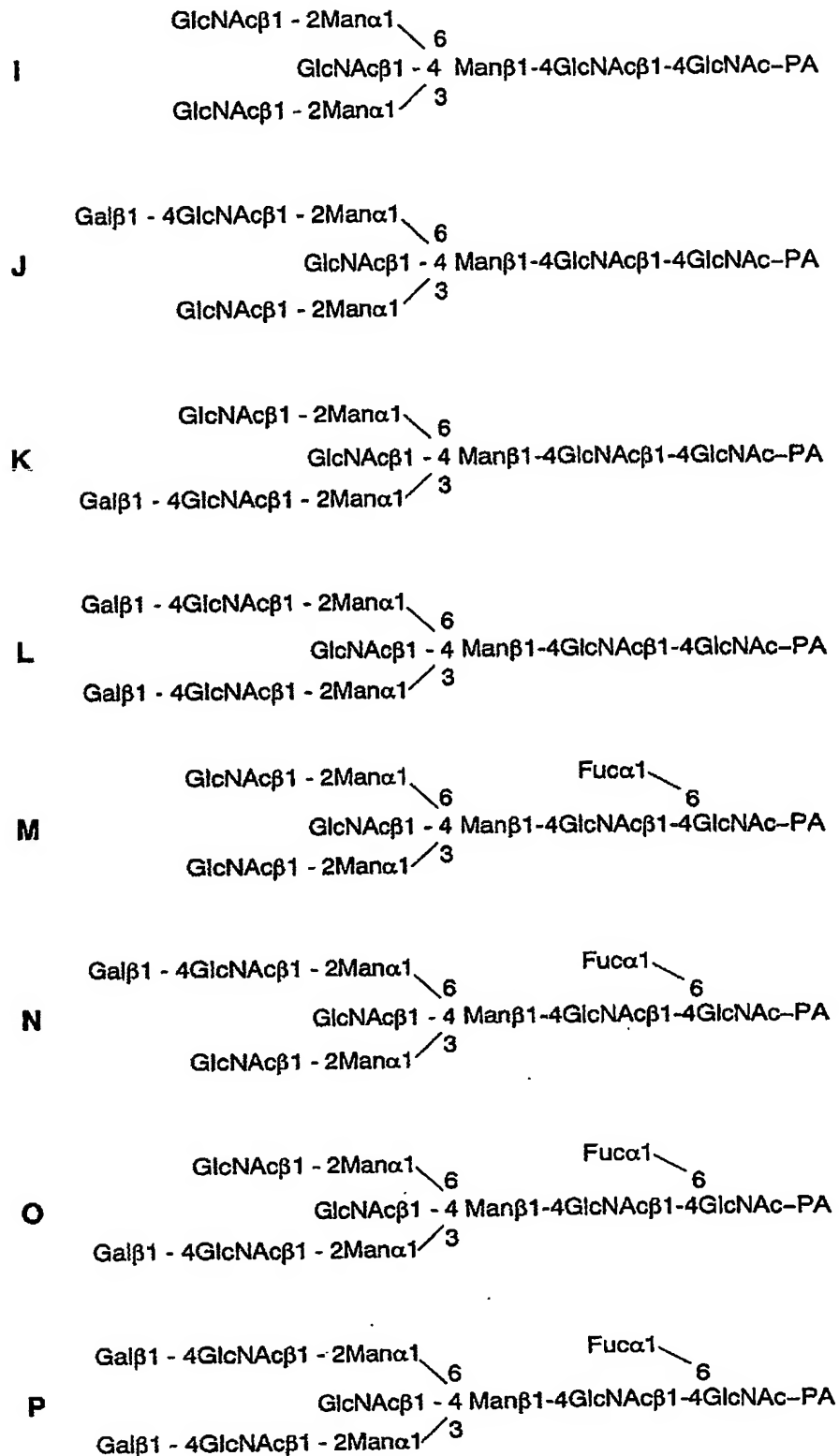
【図 5】

図 5



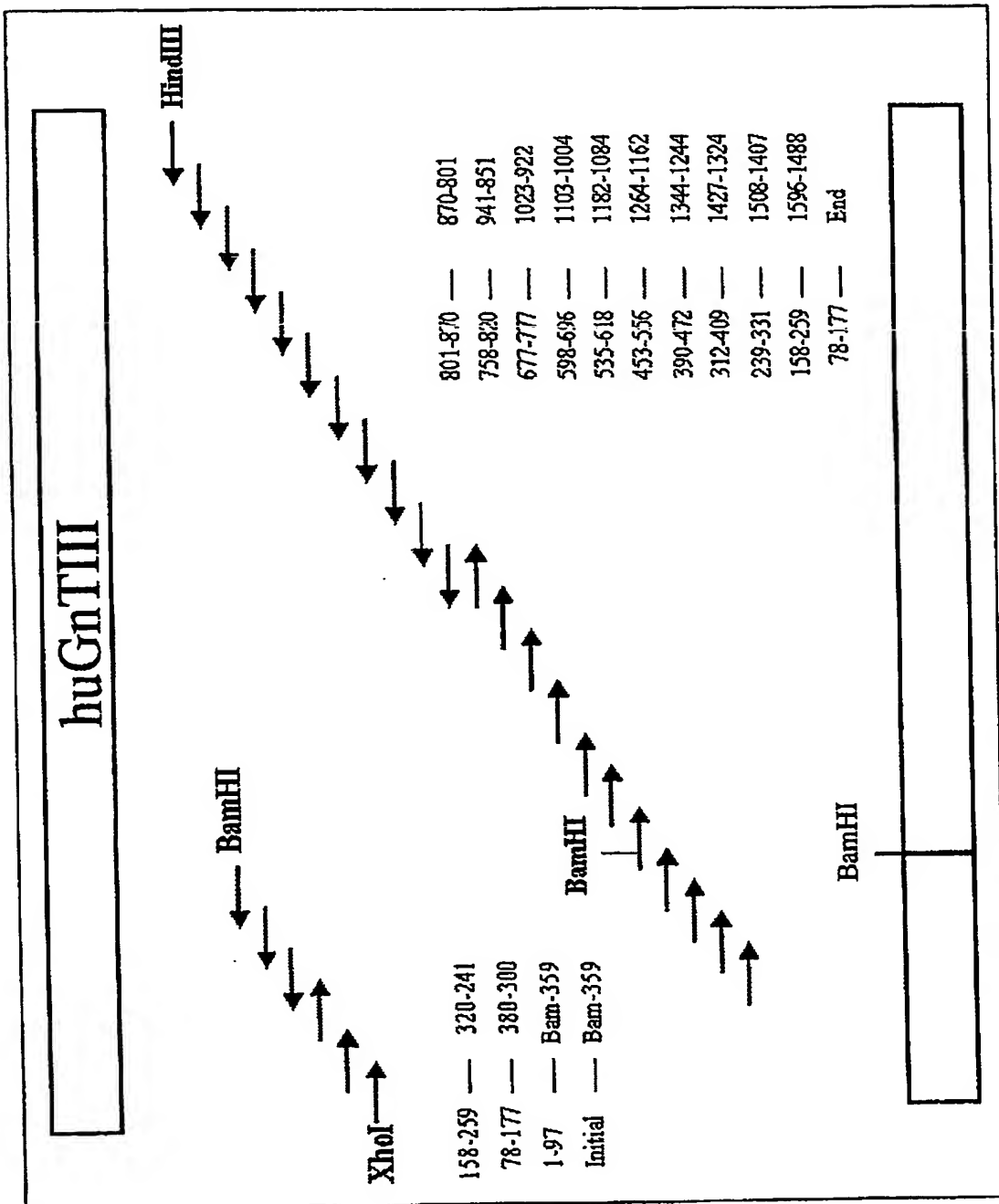
【図 6】

図 6



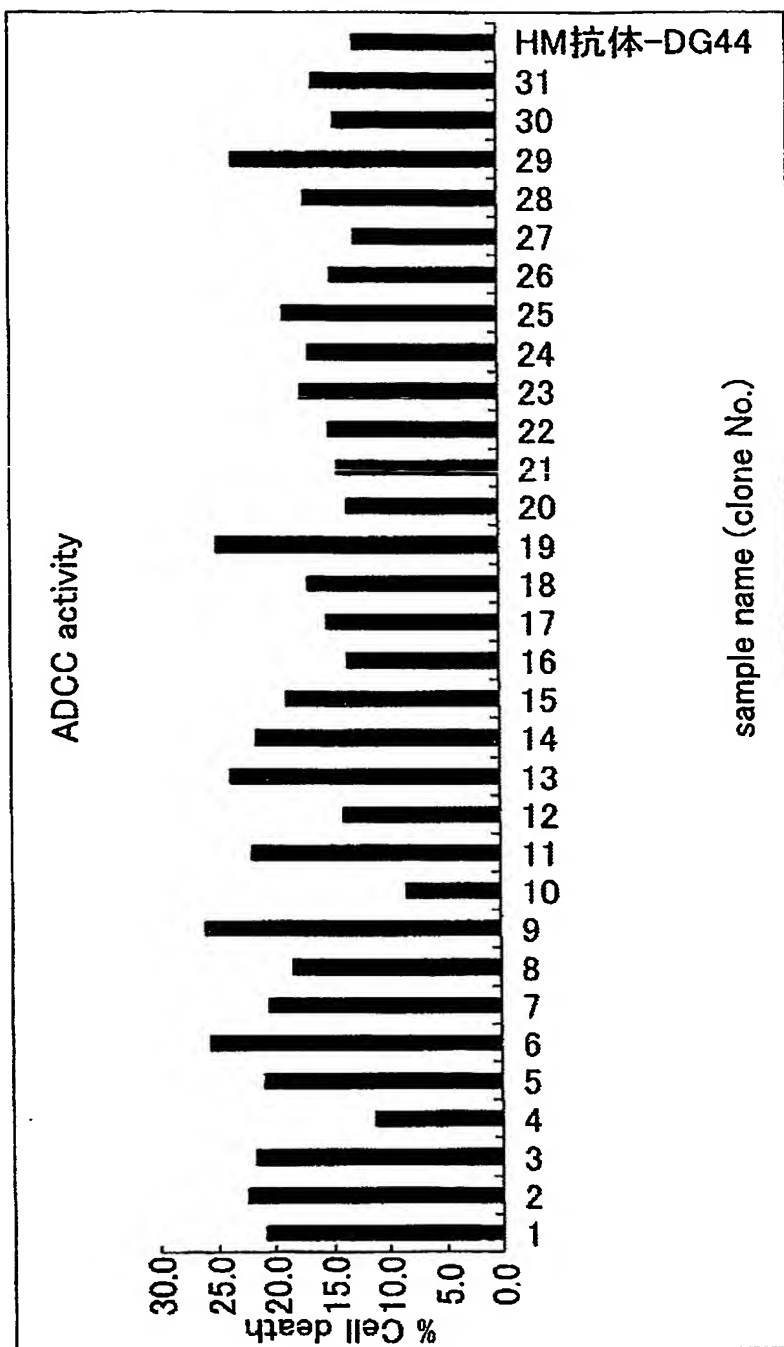
【図 7】

图7



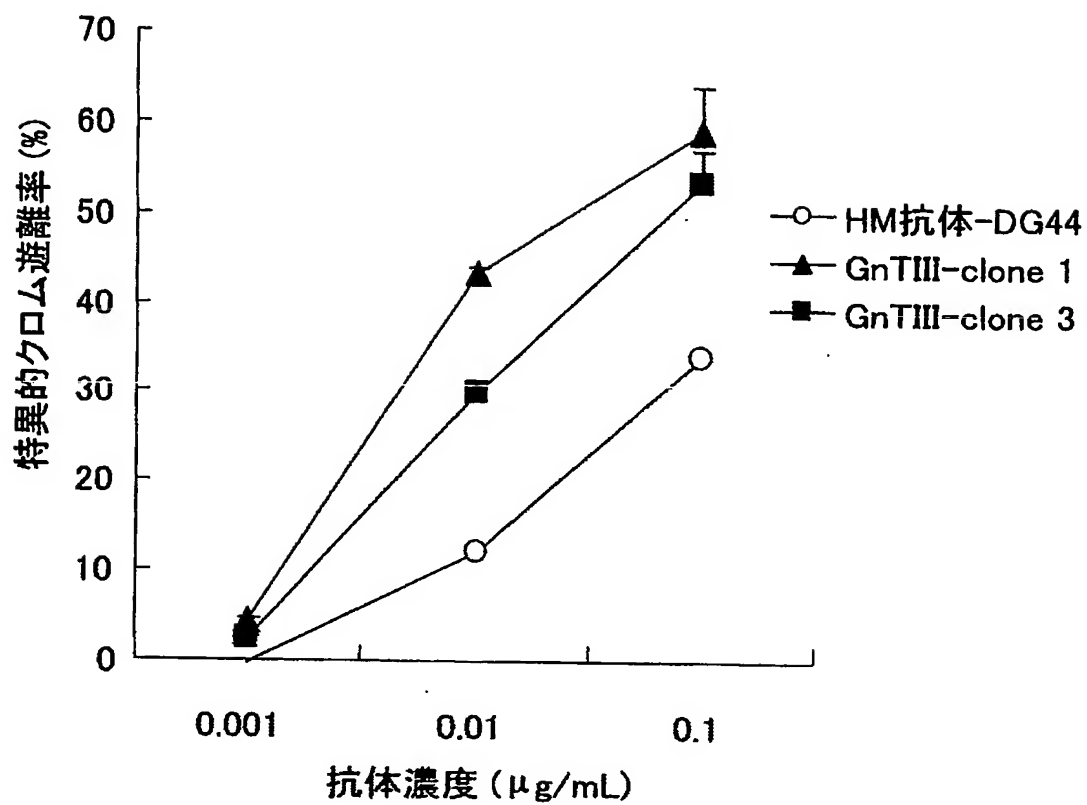
【図 8】

図 8



【図9】

図9



【図10】

図10

```
GnTIII mut.nuc      1:ATGAGACGCTACAAGCTCTTTCTCATGTTCTGTATGGCCGGCCCTGTGCCCTCATCTCCTTC 60
GnTIII ori.nuc      1:ATGAGACGCTACAAGCTCTTTCTCATGTTCTGTATGGCCGGCCCTGTGCCCTCATCTCCTTC 60
                      *****
GnTIII mt.nuc      61:CTGCACCTTCTCAAGACCCCTGTCCCTATGTACCTTCCACGAGAACTGGCCTCCCTCAGC 120
GnTIII ori.nuc      61:CTGCACCTTCTCAAGACCCCTGTCCCTATGTACCTTCCCGGAGAACTGGCCTCCCTCAGC 120
                      *****
GnTIII mt.nuc      121:CCTAACCTGGTGTCCAGCTTTTCTGGAACAATGCCCCGGTACGCCCCAGGCCAGCCCT 180
GnTIII ori.nuc      121:CCTAACCTGGTGTCCAGCTTTTCTGGAACAATGCCCCGGTACGCCCCAGGCCAGCCCC 180
                      *****
GnTIII mt.nuc      181:GAGCCAGGAGGCCCTGACCTGCTGCGTACCCCACTACTCCCACTCGCCCCCTGCTGCAG 240
GnTIII ori.nuc      181:GAGCCAGGAGGCCCTGACCTGCTGCGTACCCCACTACTCCCACTCGCCCCCTGCTGCAG 240
                      *****
GnTIII mt.nuc      241:CCGCTGCCGCCAGCAAGCGGCCGAGAGCTCCACCGGTGGA CTGGTGCTGCCCCGAG 300
GnTIII ori.nuc      241:CCGCTGCCGCCAGCAAGCGGCCGAGAGCTCCACCGGTGGA CTGGTGCTGCCCCGAG 300
                      *****
```

【図 11】

図 11

```

GnTIII mt.nuc  301:GACACCACGAGTATTTCGTGCGCACCAAGGCTGGAGGCGTCTGCTTCAAACCCGGCACC 360
GnTIII ori.nuc  301:GACACCACGAGTATTTCGTGCGCACCAAGGCGGCGGCTCTGCTTCAAACCCGGCACC 360
*****
*****
*****
GnTIII mt.nuc  361:AAGATGCTGGAGAGACCGCCTCCGGACGACCGGAGGAGAAGCCTGAGGGGGCCACGGA 420
GnTIII ori.nuc  361:AAGATGCTGGAGAGCGCCGCCCGGACGGCGGAGGAGAAGCCTGAGGGGGCCACGCGC 420
*****
*****
*****
GnTIII mt.nuc  421:TCCTCGGCCCGGCGACCAACCCGGTACCTCCTGAGCGCCCGGAGCGCACGGGGGCCGA 480
GnTIII ori.nuc  421:TCCTCGGCCCGGCGCCACCCCGGTACCTCCTGAGCCCGGAGCGCACGGGGGCCGA 480
*****
*****
*****
GnTIII mt.nuc  481:GGTGCACGACGCAAGTGGTGGAGTGCCTGTGTCTGCCGGATGGCACGGACCCAGCTGC 540
GnTIII ori.nuc  481:GGCGCCCGGCGCAAGTGGTGGAGTGCCTGTGTCTGCCCGGCTGGCACGGACCCAGCTGC 540
*****
*****
*****
GnTIII mt.nuc  541:GGCGTGCCCACTGTGGTGCACTTCCAACTGCCTACCAAGGAGCGGCTGGTGCCCAAG 600
GnTIII ori.nuc  541:GGCGTGCCCACTGTGGTGCACTTCCAACTGCCTACCAAGGAGCGGCTGGTGCCCAAG 600
*****
*****
*****

```

【図 12】

図12

```
GnTIII mt.nuc 601:GAGGTCCGCGCGCGTCATTAATGCTATCAACGTCAACCACGAGTTCGACCTGCTGGAC 660
GnTIII ori.nuc 601:GAGGTCCGCGCGCGTCATCAACGCCATCAACGTCAACCACGAGTTCGACCTGCTGGAC 660
          ***** ** ** *****
GnTIII mt.nuc 661:GTGCGCTCCACGAGCTGGGCGACGTGGTGGACGCCCTTGTGGTGTGGAGTCCAACTTC 720
GnTIII ori.nuc 661:GTGCGCTCCACGAGCTGGGCGACGTGGTGGACGCCCTTGTGGTGTGGAGTCCAACTTC 720
          *****
GnTIII mt.nuc 721:ACGGCTTATGGGAGCCGCGCGCTCAAGTCCGGGAGATGCTGACCAATGGCACCTTC 780
GnTIII ori.nuc 721:ACGGCTTATGGGAGCCGCGCGCTCAAGTCCGGGAGATGCTGACCAATGGCACCTTC 780
          *****
GnTIII mt.nuc 781:GAGTACATCCGCCACCAAGTGCTCTATGTCTTCCTGGACCACTTTCCTCGGAGGACGA 840
GnTIII ori.nuc 781:GAGTACATCCGCCACCAAGTGCTCTATGTCTTCCTGGACCACTTTCCTCGGCGCGG 840
          *****
GnTIII mt.nuc 841:CAAGATGGATGGATCGCCGACGACTACCTGGCGACCTTCCTCACCAGGACGGCGTCTCG 900
GnTIII ori.nuc 841:CAGGACGGTGGATCGCCGACGACTACCTGGCGACCTTCCTCACCAGGACGGCGTCTCG 900
          *****
```


【図13】

図13

```
GnTIII mt.nuc 901:CGGCTGCGCAACCTGCGGCCCGACGAGTCTTCATCATTTGACGATCGGACGAGATCCCG 960
GnTIII ori.nuc 901:CGGCTGCGCAACCTGCGGCCCGACGAGTCTTCATCATTTGACGATCGGACGAGATCCCG 960
*****
GnTIII mt.nuc 961:GCCCGTGACGGGTCCTGTCTCCTCAAGCTCTACGATGGCTGGACCGAGCCCTTCGCCTTC 1020
GnTIII ori.nuc 961:GCCCGTGACGGGTCCTTTCTCCTCAAGCTCTACGATGGCTGGACCGAGCCCTTCGCCTTC 1020
*****
GnTIII mt.nuc 1021:CACATGCGCACGTCGCTCTACGGATTCTTTTGAAGCAACCGGGCACCCCTGGAGGTGGTG 1080
GnTIII ori.nuc 1021:CACATGCGCACGTCGCTCTACGGCTTCTCTGGAAGCAGCCGGGCACCCCTGGAGGTGGTG 1080
*****
GnTIII mt.nuc 1081:TCAGGCTGCACGGTGGACATGCTGCAGGCAGTGTATGGGCTGGACGGCATCCGCCCTGCGC 1140
GnTIII ori.nuc 1081:TCAGGCTGCACGGTGGACATGCTGCAGGCAGTGTATGGGCTGGACGGCATCCGCCCTGCGC 1140
*****
GnTIII mt.nuc 1141:CGCCGCCCAATACTACACCATGCCAACTTCAGACAGTATGAGAACCGCACCGGACACATC 1200
GnTIII ori.nuc 1141:CGCCGCCCAGTACTACACCATGCCCACTTCAGACAGTATGAGAACCGCACCGGCCACATC 1200
*****
```

【図14】

図14

```
GnTIII mt.nuc 1201:CTGGTGCA GTGGTCGCTGGGAGCCCCCTCACTTCGCCGGCTGGCACTGCTCCTGGTGC 1260
GnTIII ori.nuc 1201:CTGGTGCA GTGGTCGCTGGGAGCCCCCTGCACTTCGCCGGCTGGCACTGCTCCTGGTGC 1260
*****
GnTIII mt.nuc 1261:TTCACGCCCGAGGGCATCTACTCAAGCTCGTGTCCGCCAGAAATGGCGACTTCCCACGC 1320
GnTIII ori.nuc 1261:TTCACGCCCGAGGGCATCTACTCAAGCTCGTGTCCGCCAGAAATGGCGACTTCCCACGC 1320
*****
GnTIII mt.nuc 1321:TGGGGTGACTACGAGGACAAGCGGACCTGAAC TACATCCGGGCCCTGATCCGCACCGGG 1380
GnTIII ori.nuc 1321:TGGGGTGACTACGAGGACAAGCGGACCTGAAC TACATCCGGGCCCTGATCCGCACCGGG 1380
*****
GnTIII mt.nuc 1381:GGCTGGTTCGACGGCACGCAAGAGTACCCGCCCTGCAGACCCCAGCGAGCACATGTAT 1440
GnTIII ori.nuc 1381:GGCTGGTTCGACGGCACGCAAGAGTACCCGCCCTGCAGACCCCAGCGAGCACATGTAT 1440
*****
GnTIII mt.nuc 1441:GCGCCCCAAGTACCTGTGAAGAACTACGACCGGTCCACTACCTTCTGGACAACCCCTAC 1500
GnTIII ori.nuc 1441:GCGCCCCAAGTACCTGTGAAGAACTACGACCGGTCCACTACCTTCTGGACAACCCCTAC 1500
*****
```

【図 15】

図 15

```

GnTIII mt.nuc 1501:CAGGAGCCAGGAGCACGGCTGCCGGGAGGATGGCGCCACAGGGGTCTGAAGGAAGACCG 1560
GnTIII ori.nuc 1501:CAGGAGCCAGGAGCACGGCGCGGGCGGGTGGCGCCACAGGGGTCTCCGAGGGAAGGCCG 1560
*****
*****
*****
GnTIII mt.nuc 1561:CCTGCTCGGGGAAACTGGACGAGCGGAAGTCTAG 1596
GnTIII ori.nuc 1561:CCCGCCCGGGCAAACTGGACGAGCGGAAGTCTAG 1596
*****
*****
*****

```

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 高いADCC活性を有する新規な抗HM1.24抗体の提供。

【解決手段】 糖鎖の改変により抗体依存性細胞傷害性 (Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity; ADCC) が増強された、HM1.24抗原に対する抗体 (抗HM1.24抗体、具体的には α -1,6コアーフコース (α -1,6core fucose) を含まない糖鎖を有する抗体、バイセクティング (bisecting) N-アセチルグルコサミン (GlcNAc) 構造を有する糖鎖を有する抗体、又は α -1,6コアーフコース (α -1,6core fucose) を含まない糖鎖を有し、且つバイセクティング (bisecting) N-アセチルグルコサミン (GlcNAc) 構造を有する糖鎖を有する抗体。

【選択図】 なし

特願 2003-207165

ページ： 1/E

出願人履歴情報

識別番号

[000003311]

1. 変更新月日
[変更理由]
住所
氏名

1990年 9月 5日
新規登録
東京都北区浮間5丁目5番1号
中外製薬株式会社

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER: _____**

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.